枯草芽孢杆菌 048 对雪山草鸡抗肠炎沙门氏菌感染能力的影响

朱沛霁[1,2]　徐　歆[2]　齐玉凯[2]　王洪荣[1*]

（1.扬州大学动物科技学院，扬州 225000；2.江苏立华牧业股份有限公司，常州 213100）

摘　要：本试验旨在研究枯草芽孢杆菌（BS）048 对雪山草鸡抗肠炎沙门氏菌（SE）感染能力的影响。选择 240 只体重（61.5±0.5） g 的 1 日龄雪山草鸡公鸡（SE 阴性），随机分为 4 组，每组设 3 个重复，每个重复 20 只鸡。对照组和对照感染组饲喂基础饲粮，BS 组和 BS 感染组饲喂添加 0.1%（*W*/*W*）BS048 的基础饲粮。对照感染组和 BS 感染组在 5~7 日龄时每天以 1×10^8 CFU 的 SE 感染试验鸡只，试验期 14 d。测定 BS048 对正常和 SE 感染雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏、肾脏 SE 载菌量，血清免疫球蛋白（Ig）和回肠分泌型免疫球蛋白 A（sIgA）含量，空肠黏膜碱性磷酸酶（ALP）、髓过氧化物酶（MPO）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性、总抗氧化能力（T-AOC）以及丙二醛（MDA）含量的影响。结果表明：1）与对照组相比，BS 组显著提高了雪山草鸡 8、10、14 日龄回肠 sIgA 含量（$P<0.05$），显著提高了 10、14 日龄空肠黏膜 ALP 活性（$P<0.05$），极显著提高了 10、14 日龄的空肠黏膜 T-AOC 及 T-SOD、GSH-Px 活性（$P<0.01$），显著降低了 8、14 日龄的空肠黏膜 MDA 含量（$P<0.05$）。2）与对照感染组相比，BS 感染组极显著减少了 SE 感染雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏和肾脏 SE 载菌量（$P<0.01$），显著提高了 10、14 日龄的血清 IgA、IgG、IgM 及 8、10、14 日龄的回肠 sIgA 含量（$P<0.05$），显著提高了 8、10、14 日龄的空肠黏膜 ALP 活性 $P<0.05$），极显著降低了 8、10、14 日龄的空肠黏膜 MPO 活性（$P<0.01$），显著或极显著提高了 8、10、14 日龄的空肠黏膜 T-AOC 及 T-SOD、GSH-Px 活性（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），显著或极显著降低了 8、10、14 日龄的空肠黏膜 MDA 含量（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。由此可见，BS048 能够增强雪山草鸡的抗 SE 感染能力。

关键词：枯草芽孢杆菌；雪山草鸡；肠炎沙门氏菌；抗感染

中图分类号：S831

沙门氏菌属（*Salmonella*）是一种革兰氏阴性、兼性厌氧的胞内菌，广泛分布于自然界中，其成员可感染人和多种动物，大部分具有很强的致病性[1]。其中，肠炎沙门氏菌

收稿日期：2016-08-25

基金项目：益生素在黄羽肉鸡养殖中的应用效果项目；Danisco Animal Nutrtion 与扬州大学动物科技学院合作项目

作者简介：朱沛霁（1977—），男，江苏南通人，博士研究生，研究方向为微生态制剂与黄羽肉鸡营养。E-mail： 2568758585@qq.com。

*通信作者：王洪荣，教授，博士生导师，E-mail： hrwang@yzu.edu.cn

（*Salmonella enteritis*，SE）可使家禽出现肠炎、生产性能降低，甚至死亡，并且被该菌污染的家禽产品能够进一步导致人的急性胃肠炎，严重危害人类健康和公共卫生安全[2]。枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，BS）是一种能够产生抗逆性内生孢子的需氧革兰氏阳性菌。作为一种优质、安全的益生菌，其具有提高动物生长性能、增强机体免疫、抗菌、改善肠道菌群、提高机体抗氧化功能等多种功能[3]。而目前关于 BS 对黄羽肉鸡抗沙门氏菌感染能力的影响及其机理的研究鲜有报道。雪山草鸡为优质黄羽肉鸡品种之一，是由常州立华牧业股份有限公司科研人员以中国优质地方良种藏鸡、茶花鸡为主要素材，经多种杂交选育而成的草鸡新品种，具有肉质鲜美、抗病能力强、饲养简单、经济效益高等优点。本研究旨在明晰 BS048 对雪山草鸡抗 SE 感染能力的影响及其机理，从而为新型 BS 制剂的开发及其在优质黄羽肉鸡生产中的应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1 日龄雪山草鸡公鸡，江苏立华牧业股份有限公司提供；BS048 制剂，山东宝来利来生物工程股份有限公司制备，活菌含量为 5×10^8 CFU/g；SE ATCC13076 菌株，江苏省家禽科学研究所提供；鸡免疫球蛋白 A（IgA）、免疫球蛋白 G（IgG）、免疫球蛋白 M（IgM）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒，美国 Life Diagnostics 公司提供；碱性磷酸酶（ALP）、髓过氧化物酶（MPO）、总抗氧化能力（T-AOC）、总超氧化物气化酶（T-SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供，其他常规试剂均为分析纯，由生工生物工程（上海）股份有限公司提供。主要仪器包括 MK3 酶标仪（美国 Thermo 公司）、UV-2100 型紫外可见分光光度计[尤尼柯（上海）仪器有限公司]等。

1.2　试验方法

1.2.1　试验设计及饲养管理

选取 240 只 1 日龄体重（61.5±0.5） g 雪山草鸡公鸡（SE 阴性），随机分为 4 组，每组设 3 个重复，每个重复 20 只鸡。对照组和对照感染组饲喂基础饲粮，BS 组和 BS 感染组饲喂添加 0.1%（*W*/*W*）BS048 的基础饲粮。对照感染组和 BS 感染组采用强饲法在 5~7 日龄时每天口服 1 mL SE 菌液（细菌浓度为 1×10^8 CFU/mL）攻毒，对照组和 BS 组口服相同剂量的无菌生理盐水。试验期 14 d。

基础饲粮参照中华人民共和国农业行业标准《鸡饲养标准》（NY/T 33—2004）配制，其组成及营养水平见表 1。饲养试验在江苏立华牧业股份有限公司实验鸡场完成。饲养方式为

地面平养，自由采食，充足饮水，光照、免疫以及其他管理均按常规进行。试验期间，每日观察鸡只的健康状况，记录死淘情况。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basic diet (air-dry basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	50.96
次粉 Wheat middling	10.00
米糠粕 Rice bran meal	1.15
豆粕 Soybean meal	30.68
玉米蛋白粉 Corn protein meal	1.81
米糠油 Rice bran oil	1.50
石粉 Limestone	1.73
磷酸一二钙 MDCP	1.07
氯化胆碱 Choline chloride (60%)	0.10
预混料 Premix[1)]	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
代谢能 ME/(MJ/kg)	11.84
粗蛋白质 CP	20.30
粗灰分 Ash	4.85
钙 Ca	0.95
总磷 TP	0.63

[1)] 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet：VA 8 000 IU，VD_3 2 500 IU，VE 35 mg，VK_3 1.5 mg，VB_1 3 mg，VB_2 10 mg，VB_6 4 mg，泛酸 pantothenic acid 10 mg，烟酸 nicotinic acid 30 mg，叶酸 folic acid 0.5 mg，生物素 biotin 0.2 mg，Cu 6.5 mg，Fe 80 mg，Zn 65 mg，Mn 80 mg，I 0.6 mg，Se 0.2 mg。

[2)] 营养水平均为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.2.2　样品收集与指标测定

肉仔鸡分别在 8、10、14 日龄（即 SE 攻毒结束后第 1、3、7 天）采集样品。每组分别选取 6 只体重相近的鸡只（每个重复 2 只）屠宰取样。心脏取血，断颈处死，打开腹腔，迅速分离并取出肝脏、肾脏和肠段（空肠、回肠和盲肠），4 ℃保存待用。

组织 SE 载菌量：称取适量盲肠黏膜、肝脏、肾脏，加入 3 mL 无菌磷酸盐缓冲液（PBS），冰浴匀浆 2 min 并做 10 倍系列梯度稀释，取原液及其各浓度稀释液 100 μL 均匀涂布于 XLT-4 琼脂平板表面，置于生化培养箱，37 ℃培养 24 h，计数 SE 典型菌落。

血清免疫球蛋白含量：促凝血 37 ℃水浴 1 h，1 000×g 离心 10 min，取适量上清液，以 ELISA 试剂盒检测其中的 IgA、IgG、IgM 含量，按使用说明书操作。

回肠分泌型免疫球蛋白 A（sIgA）含量：取 10 cm 回肠肠段，用 2 mL 无菌生理盐水冲洗肠管并收集冲洗液至无菌 1.5 mL 离心管，5 000×g、4 ℃离心 15 min，取适量上清液，以 ELISA 试剂盒检测其中的 sIgA 含量，按使用说明书操作。

ALP、MPO 活性及抗氧化指标：称取约 0.1 g 空肠黏膜按 1：9（*W/V*）加入生理盐水，冰浴匀浆 2 min，1 500×*g* 离心 10 min，取适量上清液，以南京建成试剂盒测定其中的 ALP、MPO、T-SOD、GSH-Px 活性及 T-AOC 和 MDA 含量，按使用说明书操作。

1.3 统计分析

采用统计软件 SPSS 22.0 分析数据，以一般线性模型 GLM 进行单变量双因素方差分析，以单因素方差分析（one-way ANOVA）过程进行 Duncan 氏法多重比较，$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著，$P>0.05$ 为差异不显著，$0.05\leq P<0.10$ 表示有变化趋势。试验数据用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 BS048 对 SE 感染雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏、肾脏 SE 载菌量的影响

由表 2 可知，与对照感染组相比，BS 感染组雪山草鸡 8、10、14 日龄盲肠黏膜内的 SE 载菌量均极显著减少（$P<0.01$）。同时，BS 感染组 8、10 日龄肝脏和肾脏的 SE 载菌量较对照感染组均极显著下降（$P<0.01$）。

上述结果表明，雪山草鸡在连续口服 SE 攻毒 3 d 后，其盲肠黏膜、肝脏和肾脏已被 SE 感染；在基础饲粮中添加 BS048 能够显著降低 SE 对雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏和肾脏的感染程度。

表 2　BS048 对 SE 感染雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏、肾脏 SE 载菌量的影响

Table 2　Effects of BS048 on SE amount in cecal mucosa, liver and kidney of SE-infected *Xueshan* chickens　lg（CFU/g）

组别 Groups	盲肠黏膜 Cecum mucosa			肝脏 Liver			肾脏 Kidney		
	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age
对照感染组 Control infected group	5.244 ± 0.218^{Aa}	4.843 ± 0.202^{Aa}	2.108 ± 0.195^{Aa}	4.394 ± 0.177^{Aa}	3.590 ± 0.221^{Aa}	ND	4.834 ± 0.272^{Aa}	4.172 ± 0.203^{Aa}	ND
BS 感染组 BS infected group	4.404 ± 0.194^{Bb}	3.744 ± 0.154^{Bb}	ND^{Bb}	3.134 ± 0.121^{Bb}	2.085 ± 0.259^{Bb}	ND	3.896 ± 0.159^{Bb}	2.807 ± 0.231^{Bb}	ND

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），不同大写字母表示差异极显著（P<0.01），相同或无字母表示差异不显著（P>0.05）。ND 代表低于检测下限。下表同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), and with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). ND mean below the detection limit. The same as below.

表 3　BS048 对 SE 感染雪山草鸡血清免疫球蛋白和回肠 sIgA 含量的影响

Table 3　Effects of BS048 on serum immunoglobulin and ileal sIgA contents of SE-infected *Xueshan* chickens　　mg/mL

组别 Groups	免疫球蛋白 A IgA			免疫球蛋白 G IgG			免疫球蛋白 M IgM			分泌型免疫球蛋白 A sIgA		
	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age
对照组 Control group	2.588±0.192^{ab}	1.801±0.094^{Aab}	2.382±0.416^{Aab}	2.587±0.232^{a}	1.899±0.162^{a}	2.040±0.251^{Cc}	2.959±0.149^{Cb}	2.026±0.324^{ab}	2.073±0.197^{ab}	14.523±2.167^{ABab}	17.293±2.021^{ABbc}	19.821±2.530^{Bc}
BS 组 BS group	2.719±0.124^{a}	1.922±0.135^{Aa}	2.775±0.389^{Aa}	2.610±0.244^{a}	2.198±0.210^{ab}	2.351±0.099^{CBc}	3.068±0.130^{BCb}	2.214±0.286^{ab}	2.247±0.082^{a}	17.789±2.009^{Aa}	22.206±2.587^{Aa}	25.617±2.283^{ABb}
对照感染组 Control infected group	2.324±0.150^{b}	1.354±0.141^{Bc}	1.389±0.081^{Bc}	2.062±0.192^{b}	1.840±0.131^{a}	3.193±0.320^{ABb}	3.590±0.322^{ABa}	1.937±0.118^{b}	1.938±0.173^{b}	9.802±1.691^{Bc}	13.264±1.752^{Bc}	26.410±3.197^{ABb}
BS 感染组 BS infected group	2.418±0.107^{b}	1.607±0.062^{ABb}	2.051±0.253^{ABb}	2.133±0.127^{b}	2.380±0.280^{b}	4.002±0.462^{Aa}	3.750±0.132^{Aa}	2.466±0.270^{a}	2.309±0.106^{a}	13.916±1.647^{ABb}	18.599±2.895^{ABab}	33.604±3.274^{Aa}
主效应 Main effect												
无 BS 处理	2.456±0.211	1.578±0.267	1.886±0.606	2.325±0.345	1.869±0.135	2.617±0.682	3.275±0.413	1.982±0.224	2.006±0.181	12.162±3.116	15.279±2.780	23.115±4.435

Without BS treatment												
BS 处理 BS treatment	2.569±0.195	1.765±0.196	2.413±0.493	2.372±0.314	2.289±0.243	3.176±0.952	3.409±0.391	2.340±0.285	2.278±0.091	15.852±2.683	20.402±3.152	29.610±5.051
非感染 Uninfected	2.654±0.161	1.862±0.123	2.579±0.419	2.599±0.214	2.048±0.234	2.196±0.241	3.013±0.138	2.120±0.292	2.160±0.165	16.156±2.587	19.750±3.399	22.719±3.837
感染 Infected	2.371±0.127	1.481±0.170	1.720±0.399	2.098±0.151	2.110±0.354	3.598±0.842	3.670±0.237	2.202±0.345	2.124±0.240	11.859±2.703	15.932±3.622	30.007±4.889
P 值 *P*-value												
BS 处理 BS treatment	0.221	0.020	0.020	0.702	0.007	0.014	0.279	0.045	0.012	0.010	0.006	0.004
SE 感染 SE-infected	0.010	<0.001	0.001	0.003	0.615	<0.001	<0.001	0.605	0.680	0.004	0.023	0.002
交互作用 Interaction	0.833	0.338	0.480	0.845	0.334	0.203	0.836	0.291	0.281	0.708	0.881	0.682

2.2　BS048 对 SE 感染雪山草鸡血清免疫球蛋白和回肠 sIgA 含量的影响

由表 3 可知，BS 处理对 10、14 日龄的血清 IgA、IgG、IgM 和回肠 sIgA 含量有显著影响（P<0.05），SE 感染对 7、10、14 日龄的血清 IgA 含量，7、14 日龄的血清 IgG 含量，7 日龄的血清 IgM 含量和 7、10、14 日龄的回肠 sIgA 含量有显著影响（P<0.05），而 BS 处理和 SE 感染的交互作用对 7、10、14 日龄的血清 IgA、IgG、IgM 和回肠 sIgA 含量没有显著影响（P>0.05）。

与对照组相比，BS 组 8、10、14 日龄的血清 IgA、IgG、IgM 含量均无显著变化（P>0.05）；对照感染组 10、14 日龄的血清 IgA 含量与 8 日龄的血清 IgG 含量分别显著或极显著减少了 24.80%（P<0.01）、41.68%（P<0.01）和 20.29%（P<0.05），而 14 日龄的血清 IgG 含量和 8 日龄的血清 IgM 含量极显著增加了 56.53%和 21.34%（P<0.01）；BS 感染组 8 日龄血清 IgG 含量显著减少了 17.55%（P<0.05），而 10、14 日龄的血清 IgG 含量和 8 日龄的血清 IgM 含量分别显著或极显著增加了 25.34%（P<0.05）、96.16%（P<0.01）和 26.72%（P<0.01）。同时，BS 感染组 10、14 日龄的血清 IgA、IgG、IgM 含量较对照感染组分别显著增加了 18.70%、47.61%、29.36%、25.32%、27.36%和 19.11%（P<0.05）。

与对照组相比，BS 组 10、14 日龄的回肠 sIgA 含量分别显著增加了 28.41%和 29.24%（P<0.05）；对照感染组 8 日龄的回肠 sIgA 含量显著减少了 32.50%（P<0.05），14 日龄的回肠 sIgA 含量显著增加了 33.24%（P<0.05）。同时，BS 感染组 8、10、14 日龄的回肠 sIgA 含量较对照感染组分别显著增加了 41.97%、40.22%和 27.24%（P<0.05）。

上述结果表明，基础饲粮中添加 BS048 对正常雪山草鸡血清免疫球蛋白分泌并没有显著影响，却能够显著促进其肠道 sIgA 的分泌；而 SE 感染会导致血清免疫球蛋白和肠道 sIgA 的消耗与产生；基础饲粮中添加 BS048 则能够显著促进 SE 感染雪山草鸡的血清免疫球蛋白和肠道 sIgA 分泌。

2.3　BS048 对 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜 ALP 和 MPO 活性的影响

由表 4 可知，BS 处理和 SE 感染对 8、10、14 日龄空肠黏膜的 ALP 和 MPO 活性均有显著的影响（P<0.05），而 BS 处理和 SE 感染的交互作用对 7、10、14 日龄空肠黏膜的 ALP 活性没有显著影响（P>0.05），对 7、10、14 日龄空肠黏膜的 MPO 活性有显著的影响（P<0.05）。

与对照组相比，BS 组 10 日龄空肠黏膜的 ALP 活性有升高的趋势（0.05≤P<0.10），14 日龄空肠黏膜的 ALP 活性显著升高了 37.26%（P<0.05），而 8、10、14 日龄空肠黏膜的 MPO 活性均无显著变化（P>0.05）；对照感染组 8、10、14 日龄空肠黏膜的 ALP 活性分别显著或极显著降低了 61.71%（P<0.01）、55.07%（P<0.01）和 42.22%（P<0.05），8、10、14 日龄

空肠黏膜的 MPO 活性分别极显著升高了 291.92%（、294.24%和 234.23%（*P*<0.01）；BS 感染组 8 日龄空肠黏膜的 ALP 活性显著降低了 25.61%（*P*<0.05），而 8、10、14 日龄空肠黏膜的 MPO 活性分别显著或极显著升高了 98.28%（*P*<0.01）、77.58%（*P*<0.01）、41.92%（*P*<0.05）。同时，BS 感染组 8、10、14 日龄空肠黏膜的 ALP 活性较对照感染组分别显著升高了 94.29%、101.32%和 74.45%（*P*<0.05），而 8、10、14 日龄空肠黏膜的 MPO 活性则较对照感染组分别极显著降低了 49.41%、54.96%、57.54%（*P*<0.01）。

上述结果表明，在基础饲粮中添加 BS048 能够显著提高正常雪山草鸡空肠黏膜的 ALP 活性，而对空肠黏膜的 MPO 活性没有影响；而 SE 感染会显著降低雪山草鸡空肠黏膜 ALP 活性并提高 MPO 活性；在基础饲粮中添加 BS048 则能够显著提高 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜的 ALP 活性并降低 MPO 活性。

表 4　BS048 对 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜 ALP 和 MPO 活性的影响

Table 4　Effects of BS048 on activities of ALP and MPO in jejunum mucosal of SE-infected *Xueshan* chickens

组别 Groups	碱性磷酸酶 ALP/(mg/g prot)			髓过氧化物酶 MPO/(U/g prot)		
	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age
对照组 Control group	176.052±7.879^{Aa}	191.575±9.283^{Aab}	198.244±28.515^{ABb}	0.274±0.034^{Cc}	0.345±0.055^{Cc}	0.421±0.052^{Bc}
BS 组 BS group	196.310±26.033^{Aa}	249.864±35.886^{Aa}	272.107±39.907^{Aa}	0.316±0.089^{Cc}	0.467±0.116^{BCc}	0.441±0.064^{Bc}
对照感染组 Control infected group	67.405±24.733^{Bc}	86.067±47.721^{Bc}	114.552±34.413^{Bc}	1.073±0.108^{Aa}	1.362±0.149^{Aa}	1.405±0.105^{Aa}
BS 感染组 BS infected group	130.960±28.435^{ABb}	173.274±25.823^{ABb}	199.836±19.634^{ABb}	0.543±0.065^{Bb}	0.613±0.030^{Bb}	0.597±0.093^{Bb}

主效应 Main effect						
无 BS 处理 Without BS treatment	121.728±61.731	138.821±65.460	156.398±53.854	0.673±0.443	0.854±0.565	0.913±0.545
BS 处理 BS treatment	163.635±43.309	211.569±50.415	235.972±48.561	0.429±0.142	0.499±0.135	0.519±0.111
非感染 Uninfected	186.181±20.471	220.720±39.609	235.175±50.981	0.295±0.065	0.365±0.060	0.431±0.053
感染 Infected	99.183±42.189	129.670±58.815	157.194±53.009	0.808±0.301	0.988±0.421	1.001±0.452
P 值 *P*-value						
BS 处理 BS treatment	0.014	0.005	0.002	0.001	<0.001	<0.001
SE 感染 SE-infected	<0.001	0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001
交互作用 Interaction	0.145	0.468	0.762	<0.001	<0.001	<0.001

表 5　BS048 对 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜抗氧化功能的影响

Table 5　Effects of BS048 on jejunum mucosal antioxidant functions of SE-infected *Xueshan* chickens

组别 Groups	总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)			总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mg prot)			谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)			丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)		
	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age	8 日龄 8 days of age	10 日龄 10 days of age	14 日龄 14 days of age
对照组 Control group	1.933±0.232^{ABab}	2.623±0.207^{Bb}	3.555±0.556^{Bb}	173.712±23.705^{ABab}	254.442±32.559^{ABb}	287.803±35.009^{BCc}	0.237±0.055^{a}	0.347±0.033^{Bb}	0.486±0.045^{BCb}	0.146±0.025^{ABb}	0.173±0.047^{Bbc}	0.181±0.033^{ABb}
BS 组 BS group	2.186±0.227^{Aa}	3.599±0.314^{Aa}	5.083±0.687^{Aa}	203.398±16.909^{Aa}	345.615±44.490^{Aa}	496.510±45.214^{Aa}	0.259±0.059^{a}	0.498±0.059^{Aa}	0.848±0.098^{Aa}	0.090±0.019^{Bc}	0.115±0.013^{Bc}	0.108±0.026^{Bc}
对照感染组 Control infected group	0.993±0.142^{Cc}	2.084±0.245^{Bc}	2.548±0.304^{Bc}	124.933±10.314^{Bc}	167.755±22.619^{Bc}	192.718±30.297^{Cd}	0.121±0.047^{b}	0.223±0.012^{Cc}	0.311±0.063^{Cc}	0.196±0.021^{Aa}	0.326±0.041^{Aa}	0.242±0.031^{Aa}
BS 感染组 BS infected group	1.618±0.139^{Bb}	2.556±0.127^{Bb}	3.850±0.390^{Bb}	165.608±18.010^{ABb}	276.120±30.233^{Ab}	390.495±44.277^{ABb}	0.220±0.029^{a}	0.333±0.054^{BCb}	0.576±0.061^{Bb}	0.139±0.036^{ABb}	0.200±0.028^{Bb}	0.175±0.030^{ABb}
主效应 Main effect												
无 BS 处理 Without BS treatment	1.463±0.542	2.354±0.359	3.052±0.682	157.656±26.110	211.099±53.694	240.261±59.748	0.179±0.078	0.285±0.072	0.398±0.108	0.171±0.034	0.250±0.091	0.211±0.044

BS 处理 BS treatment	1.902±0.354	3.077±0.610	4.467±0.837	184.503±25.933	310.868±51.051	443.503±70.524	0.240±0.047	0.416±0.103	0.712±0.166	0.157±0.051	0.166±0.043	0.141±0.044
非感染 Uninfected	2.059±0.248	3.111±0.585	4.319±1.004	188.555±24.566	300.029±60.906	392.157±119.898	0.248±0.053	0.423±0.093	0.667±0.210	0.144±0.043	0.144±0.028	0.144±0.048
感染 Infected	1.306±0.365	2.320±0.312	3.199±0.779	153.604±21.220	221.938±63.978	291.607±113.517	0.171±0.065	0.278±0.070	0.443±0.155	0.263±0.085	0.263±0.076	0.208±0.056
P 值 *P*-value												
BS 处理 BS treatment	0.004	0.001	0.001	0.045	0.001	<0.001	0.064	0.001	<0.001	0.006	0.001	0.004
SE 感染 SE-infected	<0.001	<0.001	0.005	0.015	0.004	0.002	0.025	<0.001	0.001	0.011	<0.001	0.006
交互作用 Interaction	0.129	0.098	0.707	0.809	0.668	0.815	0.212	0.440	0.261	0.974	0.124	0.859

2.4　BS048 对 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜抗氧化功能的影响

由表 5 可知，BS 处理对 8、10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC、T-SOD 活性、MDA 含量和 10、14 日龄空肠黏膜的 GSH-Px 活性有显著影响（P<0.05），SE 感染对 7、10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC、T-SOD 活性、GSH-Px 活性、MDA 含量有显著影响（P<0.05），而 BS 处理和 SE 感染的交互作用对 7、10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC、T-SOD 活性、GSH-Px 活性、MDA 含量没有显著影响（P>0.05）。

与对照组相比，BS 组 10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC 及 T-SOD、GSH-Px 活性分别显著或极显著提高了 37.20%（P<0.01）、43.00%（P<0.01）、35.83%（P<0.05）、72.52%（P<0.01）、43.81%（P<0.01）和 74.52%（P<0.01），8、14 日龄空肠黏膜的 MDA 含量分别显著减少了 38.28%和 40.47%（P<0.05），10 日龄空肠黏膜的 MDA 含量有减少的趋势（0.05≤P<0.10）；对照感染组 8、10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC 及 T-SOD、GSH-Px 活性分别显著或极显著降低了 48.60%（P<0.01）、20.55%（P<0.05）、28.31%（P<0.05）、28.08%（P<0.05）、34.07%（P<0.05）、33.04%（P<0.05）、48.96%（P<0.05）、35.79%（P<0.01）和 36.00%（P<0.05），8、10、14 日龄空肠黏膜的 MDA 含量分别显著或极显著增加了 33.95%（P<0.05）、88.02%（P<0.01）和 33.63%（P<0.05）；BS 感染组 14 日龄空肠黏膜的 T-SOD 活性显著提高了 35.68%（P<0.05）。同时，BS 感染组 8、10、14 日龄空肠黏膜的 T-AOC 及 T-SOD、GSH-Px 活性较对照感染组分别显著或极显著提高了 62.91%（P<0.01）、22.63%（P<0.05）、51.09%（P<0.05）、32.56%（P<0.05）、64.60%（P<0.01）、102.63%（P<0.01）、81.96%（P<0.05）、49.68%（P<0.05）和 85.33%（P<0.01），而 8、10、14 日龄空肠黏膜的 MDA 含量较对照感染组分别显著或极显著减少了 28.88%（P<0.05）、38.64%（P<0.01）和 27.73%（P<0.05）。

上述结果表明，在基础饲粮中添加 BS048 能够显著增强正常雪山草鸡的小肠抗氧化功能；而 SE 感染会显著削弱小肠抗氧化功能；在基础饲粮中添加 BS048 则能够显著提高 SE 感染雪山草鸡的小肠抗氧化功能。

3　讨　论

本试验中，雪山草鸡在 SE 连续口服攻毒 3 d 后，其盲肠黏膜、肝脏和肾脏中均存在大量 SE，且盲肠黏膜 SE 载菌量远高于肝脏和肾脏，说明 SE 首先入侵并感染盲肠黏膜，随后继续感染肝脏和肾脏。该试验结果也证明了雪山草鸡 SE 攻毒模型的成功建立，可用于后续研究。同时，组织 SE 载菌量试验还发现，在基础饲粮中添加 BS048 能够显著降低 SE 对雪山草鸡盲肠黏膜、肝脏和肾脏的感染程度，表明 BS048 在雪山草鸡感染 SE 的过程中发挥了较好的保护作用。该结论可与王爱萍等[4]和向贵友等[5]的研究结果相验证。

血清 IgG 和肠道 sIgA 是机体特异性免疫的重要组成部分，二者分别在体液免疫和肠道黏膜免疫中起关键作用。本试验中，基础饲粮中添加 BS048 可显著促进雪山草鸡肠道 sIgA 的分泌，这说明 BS048 能够增强其肠道黏膜免疫，从而提高其肠道黏膜的抗感染能力；而 SE 感染导致了雪山草鸡血清免疫球蛋白和肠道 sIgA 的消耗与产生，这说明 SE 感染同时启动了其体液免疫和肠道黏膜免疫；基础饲粮中添加 BS048 则能够显著促进 SE 感染雪山草鸡的血清免疫球蛋白和肠道 sIgA 分泌，这说明 BS048 能够在雪山草鸡感染 SE 的过程中增强其体液免疫和肠道黏膜免疫，从而增强机体对 SE 的特异性免疫，提高机体对 SE 的清除和杀灭能力。该结论与之前组织 SE 载菌量试验的结果相符。

ALP 是一种在动物体内普遍存在的磷酸单脂水解酶，根据其表达的组织部位可分为 4 种同工酶，即肠 ALP、胎盘 ALP、生殖细胞 ALP 和组织非特异性 ALP（包括肝、骨、肾 ALP）[6]。其中，肠 ALP 在肠黏膜屏障的维护中发挥着重要作用，包括调节十二指肠表面 pH、解除脂多糖（LPS）和游离核苷酸的毒性、抑制肠道炎症反应、调节肠道菌群等[7]。MPO 存在于髓系细胞（主要是中性粒细胞和单核细胞）的嗜苯胺蓝颗粒中，是髓系细胞的特异性标志。作为中性粒细胞的功能标志和激活标志，MPO 的活性可用于衡量组织的中性粒细胞浸润情况。本试验中，在基础饲粮中添加 BS048 能够显著增加正常雪山草鸡空肠黏膜的 ALP 活性，而对 MPO 活性没有影响，这说明 BS048 不仅不会导致小肠黏膜的损伤和局部炎症，还能够增强小肠黏膜屏障；而 SE 感染会显著降低雪山草鸡空肠黏膜 ALP 活性并提高 MPO 活性，这说明 SE 不仅入侵了其小肠黏膜屏障，损伤小肠黏膜，而且引起其小肠黏膜的局部炎症，导致中性粒细胞浸润；在基础饲粮中添加 BS048 则能够显著提高 SE 感染雪山草鸡空肠黏膜的 ALP 活性并降低 MPO 活性，这说明 BS048 能够在雪山草鸡感染 SE 的过程中对其小肠黏膜起到一定的保护作用，降低了其小肠黏膜的损伤和炎症程度。本研究中，BS048 对 SE 感染雪山草鸡小肠 MPO 活性的影响，与 Li 等[8]的研究结果类似。

动物机体内存在着完善的抗氧化系统，防止自由基的过度累积，避免机体遭受氧化损伤。本试验中，在基础饲粮中添加 BS048 能够显著增强正常雪山草鸡的小肠抗氧化功能，这与李卫芬等[9]的研究结果相近。当病原微生物（细菌、病毒等）入侵机体时，动物机体处于应激状态，其产生大量的活性氧（ROS）和活性氮（RNS）等自由基和炎症因子，用于杀灭病原微生物。但该抗感染机制的副作用为组织的氧化和炎症损伤，从而影响其正常生理功能（如新陈代谢、免疫、抗氧化等）。宫秀燕等[10]发现，SE 感染可降低肉鸡抗氧化功能，而饲粮添加凝结芽孢杆菌能够通过提高肉鸡的抗氧化能力而缓解因 SE 感染所造成的氧化应激。这与本研究结果一致。

4 结 论

BS048 能够增强雪山草鸡的抗 SE 感染能力，包括：

① 增强机体的体液免疫和肠道黏膜免疫，促进 SE 的清除和杀灭；

② 增强肠道黏膜屏障，降低 SE 感染引起的损伤和炎症；

③ 增强肠道抗氧化功能，缓解因细菌感染引起的氧化应激，保护组织及其正常功能。

参考文献：

[1] 贺奋义.沙门氏菌的研究进展[J].中国畜牧兽医,2006,33(11):91–95.

[2] 强文军,王莹,路茜,等.β-1,3-葡聚糖对肠炎沙门氏菌感染鸡肠道氧化还原状态的影响[J].中国畜牧杂志,2010,46(23):51–55.

[3] 王宗伟,李法增,杨志平,等.枯草芽孢杆菌在畜禽营养上的研究进展[J].中国畜牧杂志,2015,51(1):80–83.

[4] 王爱萍,邓瑞广,李建科,等.几种鸡源肠道菌株对致病性沙门氏菌的体外生物拮抗试验[J].河南农业科学,2004(8):78–80.

[5] 向贵友,何明清.芽孢杆菌 B01 在鼠、鸡肠内对肠道致病菌的生物拮抗作用研究[J].四川农业大学学报,1994,12(增刊):579–584,595.

[6] SHARMA U,PAL D,PRASAD R.Alkaline phosphatase:an overview[J].Indian Journal of Clinical Biochemistry,2014,29(3):269–278.

[7] 毕景成.肠碱性磷酸酶在肠屏障中作用的研究进展[J].肠外与肠内营养,2015,22(4):244–247.

[8] LI Y,ZHANG H,CHEN Y P,et al.*Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress and intestinal damage in lipopolysaccharide-challenged broilers[J].Animal Feed Science and Technology,2015,208:119–131.

[9] 李卫芬,文静,吴红照,等.枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能和肠黏膜抗氧化及免疫功能的影响[J].中国畜牧杂志,2011,47(9):58–61.

[10] 宫秀燕,韦明,蒋秋斐,等.凝结芽孢杆菌对肠炎沙门氏菌感染肉鸡生产性能和抗氧化功能的影响[J].中国畜牧杂志,2015,51(17):74–79,98.

Effects of *Bacillus subtilis* 048 on Anti-*Salmonella enteritis* Infection Ability of *Xueshan* Chickens

ZHU Peiji[1,2] XU Xin[2] QI Yukai[2] WANG Hongrong[1*]

(1. *Institute of Animal Science and Technology, Yangzhou Agricultural University, Yangzhou* 225000, *China*; 2. *Lihua Livestock Company of Jiangsu Province, Changzhou* 213100, *China*)

Abstract: The aim of this study was conducted to investigate the effects of *Bacillus subtilis* 048 (BS048) on the anti-*Salmonella enteritis* （SE） infection ability of *Xueshan* chickens. Two hundred and fourty 1-day-old SE-negative *Xueshan* cocks with similar weight of (61.5±0.5) g were randomly divided into four groups with 3 replicates per group and 20 chickens per replicate. Chickens in the control group and control infected group were fed the basal diets, and the others in the BS group and BS infected group were fed the basal diets supplemented with 0.1% (*W/W*) BS048. The experiment lasted for 14 days. The control infected group and BS infected group were infected with 1×10^{8} CFU SE per cock each day for 3 days when they were 5-day-old, to observe the effects of the BS048 on the SE amount in cecal mucosa, liver and kidney, serum immunoglobulin (Ig) and ileal secretory immunoglobulin A （sIgA） contents, and alkaline phosphatase （ALP）, myeloperoxidase （MPO）, total superoxide dismutase （T-SOD）, glutathione peroxidase （GSH-Px） activities and total antioxidant capacity（T-AOC） and malonaldehyde （MDA）content in jejunum mucosa of normal and SE infected *Xueshan* chickens. The results showed as follows: 1) compared with the control group, BS group significantly increased the ileal sIgA content of *Xueshan* chickens at 8, 10 and 14 days of age （*P*<0.05）, and significantly increased the activity of ALP in jejunum mucosa at 10 and 14 days of age (*P*<0.05), and significantly increased the T-AOC and activity of T-SOD and GSH-Px in jejunum mucosa at 10 and 14 days of age (*P*<0.01), while significantly decreased the jejunum mucosa MDA content at 10 and 14 days of age (*P*<0.05). 2) Compared with the control infected group, BS infected group significantly reduced the SE amount in cecal mucosa, liver and kidney of SE infected *Xueshan* chickens (*P*<0.01), significantly increased the contents of IgA, IgG and IgM in saerum at 10 and 14 days of age and sIgA in ileum at 8, 10 and 14 days of age (*P*<0.05), significantly increased the jejunum mucosa ALP activity at 8, 10 and 14 days of age (*P*<0.05), significantly decreased the jejunum mucosa MPO activity at 8, 10 and 14 days of age (*P*<0.01), significantly increased the T-AOC and activity of T-SOD and GSH-Px in jejunum mucosa at 8, 10 and 14 days of age (*P*<0.05 or *P*<0.01), while significantly decreased the jejunum mucosa MDA content at 8,

*Corresponding author, professor, E-mail: hrwang@yzu.edu.cn （责任编辑 武海龙）

10 and 14 days of age (P<0.05 or P<0.01). It is concluded that S048 can enhance the anti-SE infection ability of *Xueshan* chickens.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Xueshan* chickens; *Salmonella enteritis*; anti-infection